

Ny metode kan give hurtigere måling af antibiotikaresistens i tarmen

Mikrober i vores tarme kan nedbryde antibiotika, så behandlingen ikke virker. En ny, hurtig metode til påvisning af antibiotikaresistensgener kan dog føre til bedre behandling - og ultimativt til personlige antibiotikakure for den enkelte patient.

Af Eric van der Helm og Anne Lykke,
The Novo Nordisk Foundation
Center for Biosustainability

Hvert år dør 700.000 mennesker på verdensplan af resistente infektioner. Siden opdagelsen af penicillin i 1928 har antibiotika været anvendt rutinemæssigt i sundhedsvæsenet til behandling af bakterielle infektioner. For nyligt opdagede forskere dog, at mikrober i den normale tarmflora besidder resistensgener – samlet set kaldet resistomet – som kan ødelægge effekten af antibiotika.

En sund tarm indeholder ca. 30 billioner mikrober - eller omtrent så mange celler som hele kroppen består af [1]. Mikroberne hjælper f.eks. med at fordøje maden i tarmen. Nogle af de gavnlige mikrober huser naturligt antibiotikaresistensgener, som gør dem i stand til at overleve, hvis de udsættes for antibiotika. Tarmen kan dog også blive invaderet af sygdomsfremkaldende organismer kaldet patogener, f.eks. hvis man spiser fordærvet mad. Men patogenerne kan også

erhverve sig resistensgener fra de gavnlige tarmmikrober, så de skadelige mikrober pludseligt ikke længere kan bekæmpes med antibiotika.

Samtidig er langt størstedelen af de gavnlige mikroorganismer ikke resistente overfor antibiotika og vil derfor blive udslettet, når en patient bruger antibiotika, hvilket kan have negative virkninger for helbredet. Derfor er der stor interesse i at forstå sammensætningen af tarmens resistom, især hos indlagte patienter.

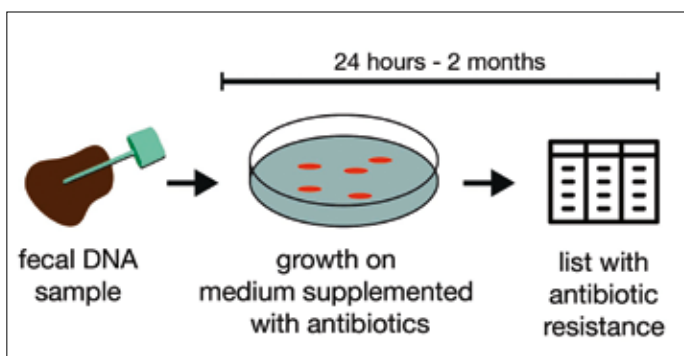
Test af gener for antibiotikaresistens kan tage to måneder

En måde at finde frem til resistensgenerne er f.eks. ved at tage en blodprøve på patienten. Prøven deles op i mindre portioner, og hver af disse tilsættes forskellige antibiotika og dyrkes. Mikroorganismer i blodet vil på den måde kun være i stand til at vokse, hvis de indeholder et resistensgen, som gør det muligt for dem at overleve antibiotikaen, se figur 1.

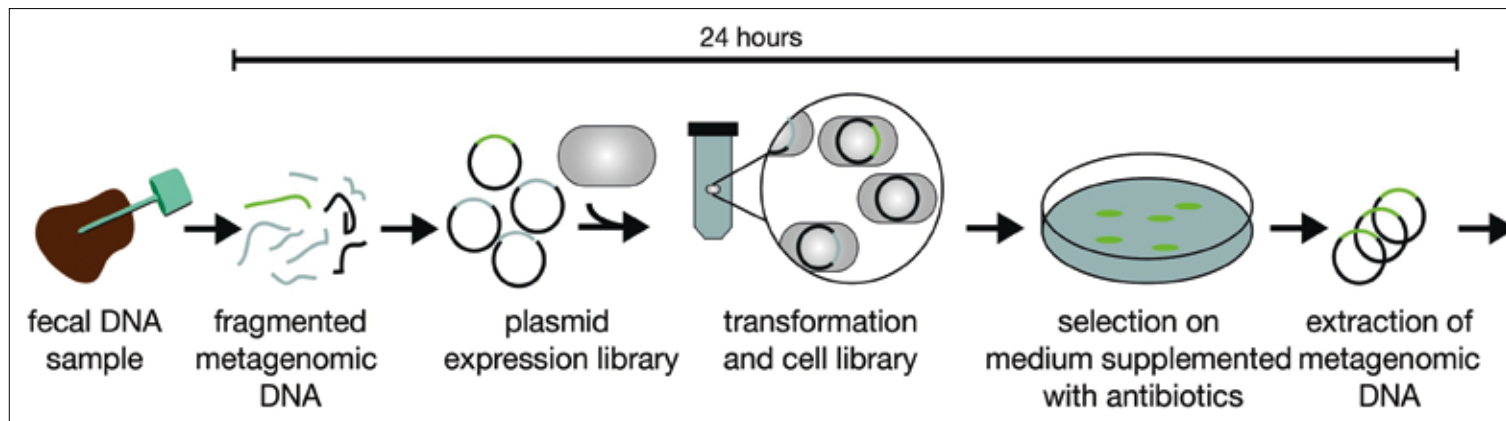
Den metode vil dog kun fortælle en læge, at en patient bærer på en resistent mikroorganisme, men ikke hvilket eksakt resistensgen der er ansvarligt. Et mere presserende problem er, at testen tager relativt lang tid at udføre, da mikroorganismene skal dyrkes i et laboratorium. Det tager f.eks. op mod to måneder, før *Mycobacterium tuberculosis* - den mikroorganisme, der forårsager tuberkulose - kan identificeres med denne metode.

En metode, som omgår den langsomme dyrkning, kaldes funktional metagenomik, figur 2, side 20. I stedet for at dyrke bakterierne, udtrækker en forsker alt DNA'et fra en fæcesprøve fra patienten og placerer det i en hurtigtvoksende laboriebakterie, f.eks. *E. coli*. Colibakterierne indeholder nu DNA-fragmenter fra tarmens mikroorganismer, og nogle af dem vil derfor indeholde resistensgener.

Colibakterierne opdeles nu i små mængder, og der tilsættes igen forskellige antibiotika til prøverne, hvorefter bakterierne vokser i ca. 16 timer, figur 3. Kun colibakterier, der indeholder et resistensgen, er i stand til at vokse og danne synlige kolonier i en petriskål. Denne proces tager mindre end en dag og er ▶



Figur 1. For at bestemme patientens modtagelighed overfor en bestemt type antibiotika lader man en patientprøve - f.eks. mikrober fra fæces eller blod - vokse i en petriskål. Nogle mikroorganismer vokser meget langsomt, så det kan tage op til to måneder at dyrke dem.



Figur 2. Vores nye metode kan identificere de resistensgener, der er til stede i en prøve fra en patient.

langt hurtigere end at dyrke de patogene mikroorganismer. Det næste trin er at forstå og identificere nøjagtigt hvilke gener, der forårsager antibiotikaresistensen. Denne viden er vigtig for at kunne skræddersy behandlingen.

Hurtig og billig sekventering åbner nye muligheder

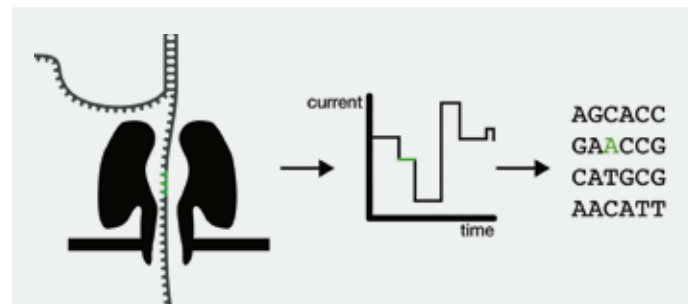
Den mest præcise måde at identificere resistensgener på er ved hjælp af DNA-sekventering. I dag findes der et utal af forskellige teknologier til sekventering af DNA, hvor den ældste metode kaldes Sanger-sekventering – opkaldt efter Nobelprisvinderen Fred Sanger. Selvom Sanger-sekventering er meget præcist, er det dyrt at opskalere. Nye teknologier, kaldet Next Generation Sequencing (NGS), er kommet ind på markedet og tilbydes af virksomheder som Illumina og PacBio. Med NGS kan man sekventere store mængder DNA på kort tid og en af de nyeste kommercielt tilgængelige NGS-teknologier er nanopore-sekventering, der tilbydes af Oxford Nanopore Technologies. Deres nanopore-sekventeringsmaskine, MinION, koster i omegnen af 1.000 dollars. Til sammenligning koster en konventio-



Figur 3. Dette er et billede af en af vores laboratorie-*E. coli*-stammer, der indeholder metagenomisk DNA, og som er dyrket i en petriskål med et bestemt antibiotikum.

nel NGS-maskine op mod 50.000-1.000.000 dollars. Den lave indkøbspris betyder bl.a., at nanopore-sekventering også kan udføres i ulande.

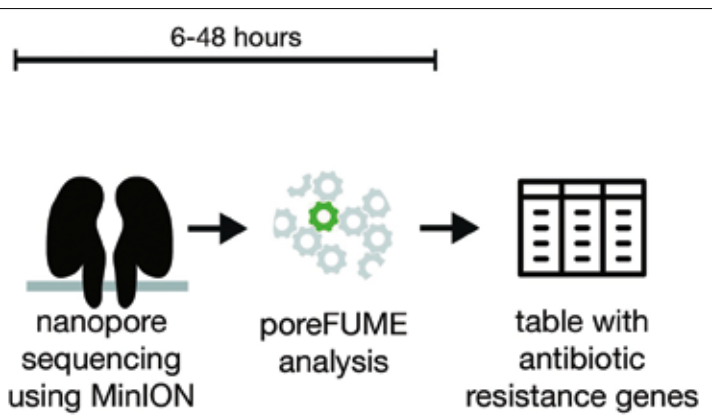
I forsøget undersøgte vi fem fækale prøver fra en intensivpatient, der havde gennemgået en lungetransplantation på grund af lungesygdommen KOL. Under opholdet på hospitalet blev patienten behandlet forebyggende med fem forskellige antibiotika. Vi anvendte funktionel metagenomik for at få DNA – og dermed identificere puljen af resistensgener – fra de fækale prøver. Derefter sekventerede vi DNA'et fra de synlige bakteriekolonier med MinION nanopore-sekventeringsmaskinen. Til sidst anvendte vi en bioinformatisk analysemetode, som vi udviklede



■ Sådan virker nanopore-sekventering

MinION sekventeringsmaskinen (en enhed på størrelse med en USB-nøgle) virker ved at detektere variationer i elektroniske strømme, når DNA-baserne glider forbi:

1. For at finde resistomet isoleres først alt det DNA fra mikroberne, der er involveret i at give resistens. DNA'et nedbrydes til to strenge, og en enkelt streng føres ned gennem MinION-sekventeringsmaskinen, som indeholder såkaldte nanoporer.
2. Hver nanopore er kun et par nano-meter bred og kan kun indeholde én DNA-streng ad gangen.
3. Der tilføres en elektrisk strøm til maskinen, og hver nanopore måler nu ændringerne i de elektriske impulser fra DNA'ets forskellige byggesten, som er placeret inde i poren.
4. De elektriske impulser sendes til en computer, hvor avanceret software oversætter signalerne til den genetiske kode.
5. Når alle DNA-strengene i prøven har passeret gennem nanoporen, samler computeren alle generne i resistomet.



Nanopore-sekventering kan føre til personlig behandling

Kombinationen af funktionel metagenomik og nanopore-sekventering er et lovende alternativ til andre sekventeringsteknologier og kan bruges til hurtigt at give en resistensgen-profil, f.eks. i tarmsystemet. En sådan profil kan føre til personlig antibiotikabehandling hos patienter med høj risiko for at udvikle resistens. Med mere målrettet behandling, hvor lægerne udvælger medicin, der ikke ”tricker” bestemte resistensgener i tarmen, vil man få en langt mere effektiv behandling og formentligt undgå at accelerere udviklingen af antibiotikaresistens.

For at personlig behandling skal blive virkelighed, er der dog brug for flere undersøgelser af, hvordan antibiotikabehandling påvirker resistens-profilen samt hvordan den efterfølgende personlige behandling påvirker resistens-profilen. Men konklusionen lader til at være, at nanopore-sekventering er et effektivt værktøj til at udføre sådanne undersøgelser hurtigt og effektivt.

E-mail:

Eric van der Helm: evand@biosustain.dtu.dk

Anne Lykke: annly@biosustain.dtu.dk

Referencer

1. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* 14, 1-14 (2016).
2. van der Helm, E. et al. Rapid resistome mapping using nanopore sequencing. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkw1328

til netop denne teknologi. Den bioinformatiske analysemetode er tilgængelig på https://github.com/EvdH0/poreFUME_paper, så alle kan efterprøve analysen.

Nøjagtigheden af resistensgen-identifikationen sammenlignet med Sanger-metoden var ca. 97%. Alligevel kunne vi med metoden identificere de 26 forskellige resistensgener, der var til stede i patientens tarm. Det viste sig, at nogle af generne gav resistens over for nogle af de antibiotika, som patienten blev behandlet med under opholdet på intensivafdelingen. Resultaterne og metoden blev offentliggjort i januar i det videnskabelige tidsskrift *Nucleic Acid Research* [2].

LabDays 2017

Fagmesse for laboratorieteknik



- LSB Temamøde
- Laborarieudstyr
- Diagnostik
- Bioteknologi
- Forskning
- Kvalitetskontrol
- Fagkonferencer
- Over 85 udstillere

Århus 20. - 21. september
labdays.dk